

## 妊婦ならびに先天性サイトメガロウイルス感染児に おけるウイルス特異的細胞性免疫能に関する研究

岡 部 稔

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾 亨 教授)

### Studies of Cytomegalovirus-Specific Cell-Mediated Immunity in Pregnant Women and Congenitally Infected Infants

Minoru OKABE

*Department of Pediatrics, Sapporo Medical College*

(Chief : Prof. T. Nakao)

Characteristics of cytomegalovirus (CMV)-specific cell-mediated immunity in congenitally infected infants and pregnant women were studied by an in vitro lymphocyte transformation (LTF) test using the whole blood culture technique. Subjects were grouped as follows; (1) 6 symptomatic congenital CMV-infected infants, (2) 11 asymptomatic congenital CMV-infected infants, (3) 3 postnatal CMV-infected infants, (4) 5 CMV-free infants, (5) 54 pregnant women, (6) 14 mothers of congenitally CMV-infected infants and (7) 16 non-pregnant women.

#### 1. Results in congenital CMV infection

- 1) All 14 blood samples from the postnatally infected group showed higher stimulation index (SI) values than 3.0, while the CMV-free group showed below 3.0 in 36 out of 38 specimens tested. Based on these results, three-time stimulation was set as the lowest value considered positive. In the congenitally infected group, 18 out of 47 (38%) specimens proved to be negative in terms of SI values.
- 2) Studies of temporal changes in CMV-LTF tests revealed that in the postnatally infected group the response turned positive in accordance with the appearance of CMV viruria and remained positive thereafter. In the congenitally infected group, the delay of positive reaction followed initial negativity, a phenomenon conspicuously observed in symptomatic subjects.
- 3) No significant difference was seen in phytohemagglutinin (PHA)-LTF tests among congenital, postnatal and control subjects.

Thus, this disorder, which was thought to lie in specific cell-mediated immunity in congenitally CMV-infected infants, seemed to be not a defect, but a delay in lymphocyte reactivity.

#### 2. Results in pregnant women

- 1) Though CMV-LTF tests were all positive in non-pregnant women, 24% of cases were negative in pregnant women. The mean SI values of CMV-LTF tests were significantly lower in pregnant women and mothers than in controls. There were no significant differences in each trimester.
- 2) A significant difference was seen in PHA-LTF tests among pregnant women, mothers and controls. There were several cases of negative CMV-LTF tests with a fairly decreased PHA-LTF response.

On the basis of the aforementioned observation, it seemed that CMV-specific cell-mediated

immunity was lessened accompanying a decrease in non-specific cell mediated immunity in pregnancy. No affirmative data, however, were obtained as to the close relationship between CMV reactivation and decreased cell-mediated immunity in pregnant women.

(Received January 28, 1981 and accepted February 16, 1981)

## 1 結 言

サイトメガロウイルス(以下 CMV)感染症における感染防禦機構には、特異的細胞性免疫が重要な役割を果たすとされ、この方面での研究が進みつつある。<sup>1-7)</sup> 其中で、先天性 CMV 感染児において、CMV 特異的細胞性免疫能の低下が見られる場合のあることを示唆する報告がある。<sup>8-12)</sup>

もし仮に、この現象が年齢を対応させた後天性 CMV 感染児との比較の上で、パターン化し得るものであれば、CMV 感染が胎児期に起ったものかどうか、一つの重要なマーカーになるであろうし、また免疫強化療法の指標ともなるわけで、重要な問題を含んでいる。

一方、妊娠中、体内に潜伏する CMV が再活性化され、かつ胎児の子宮内感染が惹起される可能性が指摘されているが、<sup>13)</sup> この再活性化現象に、特異的細胞性免疫能の低下が関与している可能性が考えられる。

本研究で著者は、細胞性免疫能を検索する手技として一般化されている Lymphocyte Transformation (LTF) 試験<sup>14)</sup>を用い、先天性 CMV 感染児、後天性 CMV 感染児および妊婦を対象として、ヒト CMV 抗原に対する特異的細胞性免疫の動態について検索を試みた。

## 2 実験材料と方法

### 2.1 研究対象

#### 2.1.1 乳 児

先天性 CMV 感染と診断されたもの 17 例で、そのうち、11 例は札幌医大産科および札幌通信病院産科において、生後 2 日目の尿からの CMV 分離によるスクリーニングで発見された無症候性 CMV 感染児であり、6 例は新生児期に種々の異常を認めウイルス学的に診断された症候性 CMV 感染児である。生後 2 日目までの尿では CMV 排泄が認められず、生後数カ月でウイルス尿を認めた、いわゆる後天性 CMV 感染児は 3 例で、これに、ウイルス尿を終始認めず、CMV に対する血清補体結合抗体も母体由来のもののみ検出された、CMV 非感染児 5 例を加え、計 25 例の乳児につき、ウイルス特異的細胞性免疫反応を検索した。このうち、症候性 CMV 感染児 3 例、無症候性 CMV 感染児 7 例、後天性

CMV 感染児 3 例、CMV 非感染児 5 例については、経時的に検索を行った。

#### 2.1.2 妊婦、非妊娠女性、先天性 CMV 感染児の母親

札幌医科大学産科を受診した妊婦のうち CMV に対する血清補体結合抗体価 4 倍以上陽性のもの 54 例、対照として、非妊娠女性 16 例また、先天性 CMV 感染児の母親 14 例(分娩後平均 6 カ月)につき、ウイルス特異的細胞性免疫反応を検索した。妊婦 7 例については、妊娠前期、中期、後期、分娩直後、および分娩後数カ月の時点での経時的検索を合せ行った。

#### 2.2 ウィルス分離および血清抗体価の測定

ウィルス分離には、CMV 感受性を有するヒト胎児肺由来線維芽細胞(human embryonic lung fibroblast: HEF)の単層培養を使用した。対象から採取した尿は、millipore membrane を通過させた後、1 検体につき、HEF 単層チューブ 2 本に 0.2 ml ずつ接種した。培養液を交換しながら 4 週間観察し、CMV 特有の細胞変性効果(cytopathic effects: CPE)を認めたものを分離陽性とした。

補体結合(complement fixing: CF)抗体価の測定は、CMV の標準株で、Baylor 医科大学 Dr. Benyesh-Melnick より分与を受け、当教室で継代保存していた AD169 株<sup>15)</sup>を抗原として Sever<sup>16)</sup>の microtechnique に従い、また CMV 感染細胞核内に出現する早期抗原(early antigen: EA)に対する抗体価測定は The et al<sup>17)</sup>の方法に依った。

#### 2.3 Lymphocyte Transformation (LTF) 試験

##### 2.3.1 CMV 抗原

CMV-LTF 試験の抗原として AD169 株を用いた。ウィルスの増殖には HEF を使い、抗原液の作製には CMV-CF 抗原の作製に準じ、glycine buffer による抽出法<sup>18)</sup>を用いた。すなわち、AD169 株を HEF に接種し、ほぼ 100% CPE が認められた段階で、0.25% trypsin で細胞を剥離し、0.02 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)で洗浄した。1500 rpm, 15 分間の遠心後、その沈渣に 0.1 M, pH 10 の glycine buffer を、もとの培養液の 1/10 量に加えて浮遊させ、37°C, 6 時間の incubation 後、1500 rpm 15 分間遠心を行い、その上清を抗原とした。box titration による CF 抗原力価

は32単位であった。抗原は、Eagle's minimum essential medium (MEM) で18時間透析後、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。使用直前に、10ワットのultraviolet (UV) ランプの直下10 cmの距離で、60分間照射し不活化した。これをRPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Gibco, plus  $\text{NaHCO}_3$  2g/l, 1N HCl 3m/l, KM 60mg/l)培養液にて1:2, 1:8, および1:32の各濃度に希釈して使用した。対照抗原は、CMV 非感染 HEF を用い、同様の方法により作製し使用した。また、症候性 CMV 感染児1例については、患児尿からの分離株 (M 478) も抗原として用いた。

### 2・3・2 標準 mitogen

標準 mitogen としては、purified phytohemagglutinin (PHA<sub>P</sub>, Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA)を使用した。PHA<sub>P</sub>はRPMI1640培養液に溶解し100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製して使用した。

### 2・3・3 培養および測定法

リンパ球の培養は、全血培養法<sup>19)</sup>にもとづいて行った。すなわち、対象の乳児、妊婦より得られたヘパリン加血を、RPMI1640培養液で、一律に乳児は15倍、妊婦は10倍に希釈した。そのリンパ球数は、約 $2 \times 10^5/\text{ml}$ であった。これを各試験管に0.5 ml ずつ分注し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ -incubatorで培養した。CMV 抗原を1:2, 1:8 および1:32の各濃度で、1本の試験管に0.05 ml ずつ加え、6~8日間の培養を行った。PHA<sub>P</sub>を加えた系列は、3日間の培養を行った。抗原の各濃度につき、培養試験管を3本ずつ、PHA<sub>P</sub>を加えた系列では2本ずつ用いた。培養終了の24時間前に、10  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ に調製した( $^3\text{H}$ ) thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR: The Radiochemical Centre, Amersham, England)を各試験管に0.05 ml ずつ添加した。培養終了後、各試験管を3% acetic acid 4 ml で洗浄し、2500 rpm, 10分間遠心、上清除去、4 ml のmethanolで洗浄し、2500 rpm, 10分間遠心、上清除去を行った。この操作を各々2回ずつ行った後に、0.6 N-NCS (NCS<sup>TM</sup>, Solbulizer, Amersham/Seale Corporation) 1 mlを加え、water bathで $60^{\circ}\text{C}$ 、30分間のincubationを行った。次に、9 ml のscintillation fluid (2,5-diphenyl oxazol 6g: 1,4-bis-2-(5-phenyl oxazol)-benzene 100mg: toluene 1000 ml)を加え、radioisotope count用バイアルに詰めて、liquid scintillation counter (Packard LS-3255, liquid scintillation spectrometer)で、そのradioactivityを測定した。測定値は3本のバイアルより得られた値の平均cpm (count per minute)として求め、stimulation index (SI=cpm of stimulated

cells/cpm of unstimulated cells)を算定した。以下の成績には各抗原希釈列および培養日数のうちで反応ピークの高い方のSI値を採用した。必要に応じてt-検定を行い、5%の危険率で有意差を判定した。なお、全血培養法によるCMV-LTF試験の基礎的検討は、田村<sup>20)</sup>により詳しく記載されている。

## 3 成 績

### 3・1 乳児における検討

#### 3・1・1 CMV-LTF 反応の月齢別検討 (Fig. 1)

対象を、LTF 検索時点で、尿中へのCMV排泄者と非排泄者とに分け、さらに排泄者は先天性症候性、先天性無症候性、および後天性に区別し、月齢別にCMV-LTF 反応のSI値をプロットしたところ、後天性感染例は全例がSI値3.0以上で、最高値30.7までの分布を示したが、CMV 尿陰性者は38例中2例を除いて、どの月齢でもSI値3.0未満であった。この成績に基づいて、以後SI値3.0を陽性限界とした。一方、先天性感染例では、生後早期にはSI値3.0未満がかなり見ら

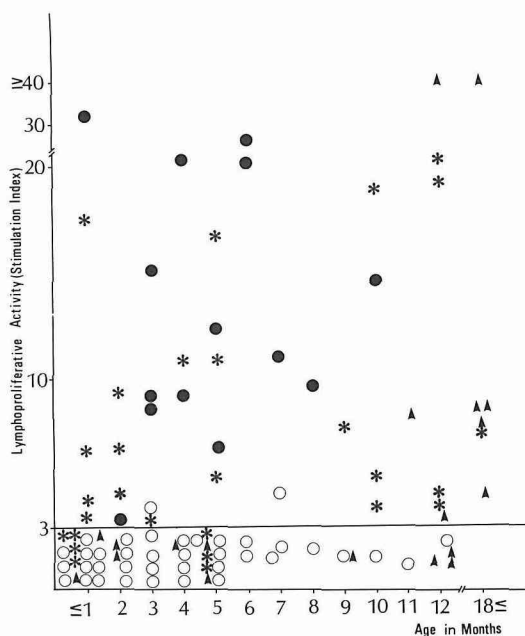


Fig. 1 Distribution of stimulation index (SI) values of lymphocyte transformation tests by cytomegalovirus (CMV) in congenitally or perinatally CMV-infected infants, and CMV-free infants.

- ▲: CMV Excretor (congenital, symptomatic)
- \*: CMV Excretor (congenital, asymptomatic)
- : CMV Excretor (postnatal)
- : Non-excretor

れ、月齢が進むにつれて有意な反応を示した。とくに症候性感染児ではこの傾向が著しく、9 カ月までは全例 SI 値 3.0 未満の陰性で、11 カ月後に陽性例が検出された。

3.1.2 CMV-LTF 反応の陽性例と陰性例の検討 (Table 1)

SI 値 3.0 を陽性限界として、CMV-LTF 反応陽性例と反応陰性例をまとめてみた。後天性感染群では 14 例全例が反応陽性であったが、先天性感染群では、47 例

Table 1. Summarized data of lymphocyte transformation tests by cytomegalovirus (CMV) in CMV excretors and non-excretors

Subjects	No. Tested	Negative (SI<3.0)	Positive (SI≥3.0)
CMV Excretors			
Acquired	14	0	14(100%)
Congenital	47	18(38%)	29(62%)
Non Excretors	38	36(95%)	2(5%)

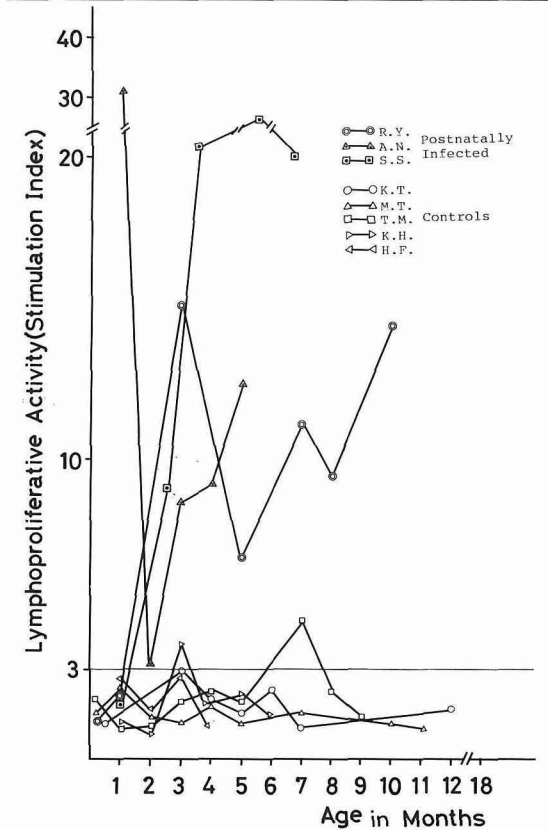


Fig. 2 Temporal changes of cytomegalovirus-specific lymphoproliferative activity in infants with postnatal cytomegalovirus infection and controls.

中 18 例すなわち 38% の反応陰性例が認められた。非感染群では 38 例中 36 例、つまり 95% が反応陰性と判定された。

3.1.3 後天性感染児と非感染児における CMV-LTF 反応の経時的検索 (Fig. 2)

非感染児 5 例を最長 13 カ月まで追跡したが、そのうち、それぞれ一度だけ有意の SI 値を示した 2 例(症例 K. H. 3.9, 症例 T. M. 4.6)を除き、すべて反応陰性であった。

後天性感染児では、いずれも出生時には、ウイルス尿陰性であったが、生後 1~3 カ月時にウイルス尿陽性となった時点で、CMV-LTF 反応も陽転し、その後、5~10 カ月の観察期間中有意の反応が持続した。

3.1.4 先天性 CMV 感染児における CMV-LTF 反応の経時的検索 (Fig. 3)

新生児期または、乳児期早期に CMV-LTF 反応が陰性であった症例の中に、遅れて陽性になる場合がみられた。この遅延傾向は症候性感染児で著しく、症例 S. Y. では 12 カ月以降、症例 N. M. では 20 カ月以降陽転し、症例 Y. K. では 12 カ月まで陰性であった。ただし、

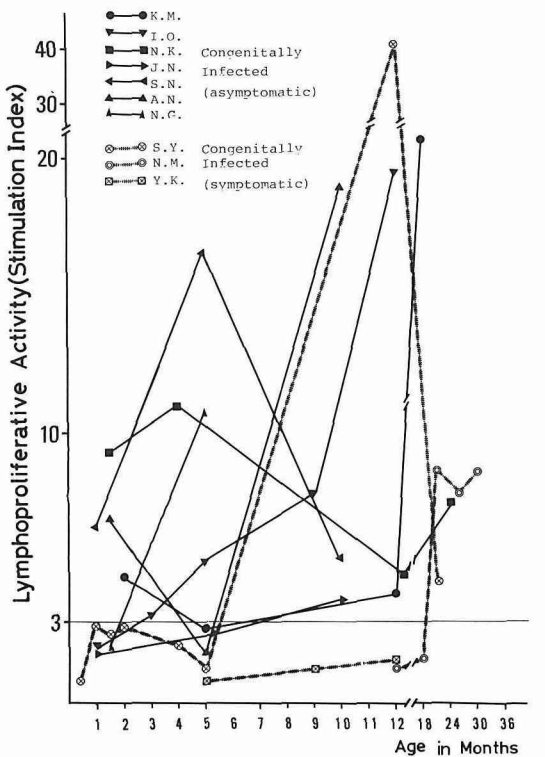


Fig. 3 Temporal changes of cytomegalovirus (CMV)-specific lymphoproliferative activity in infants with congenital CMV infection.

このうちの1例(S. Y.)では、経過中ヒト白血球由来の Interferon を2回に分けて使用しており、それに一致してLTF反応の一過性上昇を見たが、これについては別に報告するので、本論文では詳述を避ける。

3.1.5 PHA-LTF 反応の検討 (Table 2)

CMV-LTF 反応に平行して、PHA-LTF 反応を検討した。Mean SI(±ISD)は、それぞれ先天性感染群で202.7±133.1、後天性感染群で195.0±96.2、非感染群で195.6±120.4であり、3群の間には有意差は認められなかった。

Table 2. Summarized data of lymphocyte transformation tests by phytohemagglutinin(PHA) in cytomegalovirus (CMV) excretors and non-excretors

Subjects	No. Tested	Range of SI	Mean SI (±ISD)
CMV Excretors			
Acquired	14	39.6-395.3	195.0(±96.2)
Congenital	40	21.1-641.4	202.7(±133.1)
Non Excretors	37	41.0-566.5	195.6(±120.4)

3.1.6 分離株と標準株による CMV-LTF 反応の比較検討 (Table 3)

症候性感染児1例(Fig. 3のN. M.)につき、患児の尿より分離されたCMV株(M478)で抗原を作製し、LTF試験を行った。AD169標準株による反応との差異を検討したが、検索時患児は2歳で、両抗原に対してLTF反応陽性で、反応の程度に差を認めなかった。

3.2 妊婦における検討

3.2.1 妊婦ならびに非妊娠女性における血清抗体、および CMV-LTF 反応測定成績 (Table 4)

CF抗体陽性、つまり血清学的にCMV感染歴を有すると考えられたものは、妊娠前期17例中15例、妊娠中期23例中18例、妊娠後期26例中21例、合計66例中54例であった。そのうちCMV-EA抗体陽性者は、それぞれ3例、5例、3例の合計11例であった。非妊

娠女性では、CF抗体陽性者は20例中16例、そのうちCMV-EA抗体陽性者は4例であった。CF抗体陽性者70例のうち、CMV-LTF反応陰性者は13例であったが、これらは全例妊婦であった。

3.2.2 CF抗体陽性妊婦と先天性 CMV 感染児母親における CMV-LTF 反応の検索 (Fig. 4)

妊娠前期15例、妊娠中期18例、妊娠後期21例、非妊娠女性16例、および先天性CMV感染児の母親14例につき、CMV-LTF試験を行いSI値の分布を示した。

非妊娠女性ではSI値は、24.6-382.8に分布しMean SI: 175.8(±122.8)であった。妊婦では妊娠各期とも4~5例のLTF反応陰性者を認めて、SI値の分散が大きかったが、妊娠各期間では有意差はなかった。非妊娠女性と妊娠各期、および妊婦全体との比較では、妊婦において有意な低下(P<0.05)が認められた。

先天性CMV感染児の母親の反応は、妊婦同様分散が大きかったが、非妊娠女性の反応に比し有意な低下(P<0.05)を認めた。

Table 3. Lymphoproliferative activity with a standard strain(AD 169) and an isolated homologous strain(M 478) in a case of congenital symptomatic cytomegalovirus(CMV) infection

CMV Strains	Mean cpm ± ISD		SI
	CMV Ag	Control Ag	
AD 169	982.0±204.7	127.0±25.2	7.7
M 478	992.7±117.9	136.7±14.5	7.3

3.2.3 CMV-LTF 反応と CMV-EA 抗体の関係 (Fig. 5)

CMV-EA抗体陽性群と陰性群に分けて、CMV-LTF反応の検索を試みた。いずれの群でも非妊娠女性に比し、妊婦は有意に低い(P<0.05)反応を示したが、EA抗体陽性群と陰性群の間には有意差は認めなかった。

Table 4. Summarized data of lymphocyte transformation tests by cytomegalovirus(CMV) and phytohemagglutinin(PHA) in pregnant and non-pregnant women

Subjects	No. tested	No. Seropositive		CMV-LTF			PHA-LTF
		CF•Ab	EA•Ab	Neg.	Pos. (SI≥3.0)	Mean SI	Mean SI
Pregnants							
Trimester							
1st	17	15	3	4	11	72.3	481.8
2nd	23	18	5	4	14	93.4	491.5
3rd	26	21	3	5	16	43.8	411.8
Total	66	54	11	13	41	68.3	459.1
Controls	20	16	4	0	16	175.8	916.6

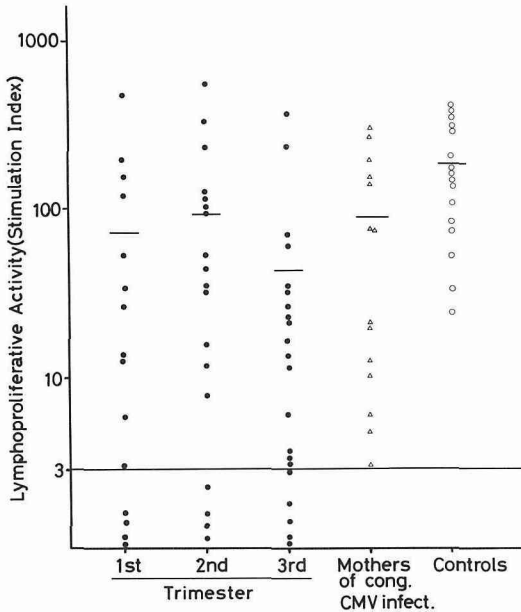


Fig. 4 Lymphoproliferative activity by cytomegalovirus (CMV) in pregnant women from each trimester, mothers of congenitally CMV-infected infants and non-pregnant women.

### 3・2・4 CF 抗体陽性妊婦と先天性 CMV 感染児の母親における PHA-LTF 反応の検討 (Fig. 6)

各期の妊婦と非妊娠女性につき、CMV-LTF 反応と平行して PHA-LTF 反応を行った。妊婦では SI 値の分散が大きかったが、妊婦と非妊娠女性との比較では、妊婦で有意 ( $P < 0.05$ ) に反応が低下していた。しかし、妊娠各期では差を認めなかった。

先天性 CMV 感染児の母親における PHA-LTF 反応は、対照に比し有意 ( $P < 0.05$ ) に低下していた。

### 3・2・5 CMV-LTF 反応と PHA-LTF 反応の相関関係 (Fig. 7)

CF 抗体陽性の妊婦 51 例と非妊娠女性 16 例につき、CMV-LTF 反応と PHA-LTF 反応の相関関係を検討した。相関係数は妊婦では  $-0.15$ 、非妊娠女性では  $0.76$  であった。また、妊婦を CMV-LTF 反応陽性群と陰性群に分けて、それぞれの群での PHA-LTF 反応を比較したところ、Mean SI 値では両群の間に有意差は認められなかったが、PHA-LTF 反応の SI 値 100 未満の著しい低下を示す例が、CMV-LTF 反応陰性群に有意 ( $P < 0.05$ ) に多かった。

### 3・2・6 妊婦における CMV-LTF 反応と PHA-LTF 反応の経時的検索 (Fig. 8, 9)

CF 抗体陽性の妊婦 7 例につき、妊娠前期、中期、後

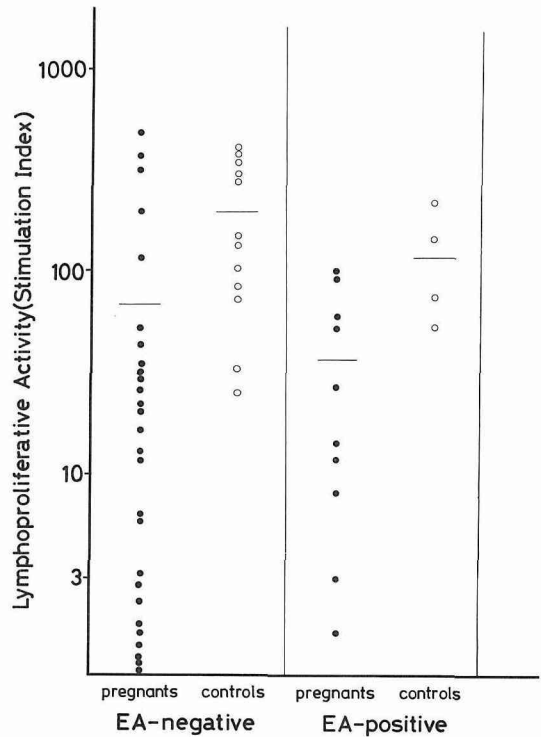


Fig. 5 Cytomegalovirus (CMV)-specific lymphoproliferative activity in EA antibody positive and negative subjects comprised of pregnant and non-pregnant women.

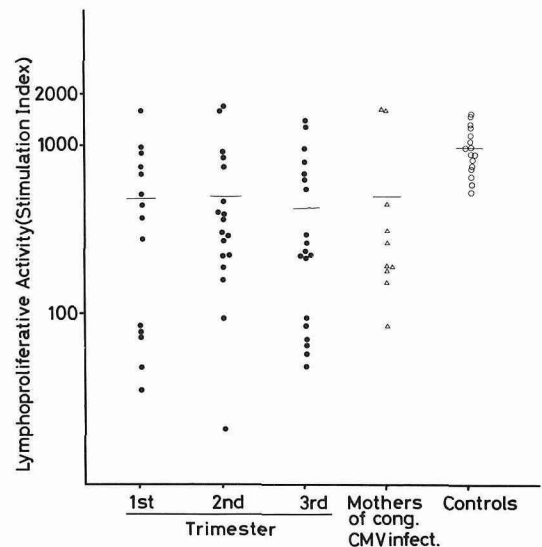


Fig. 6 Lymphoproliferative activity by phytohemagglutinin (PHA) in pregnant women from each trimester, mothers of congenitally cytomegalovirus (CMV)-infected infants and non-pregnant women.

期, および分娩後の各時期に採血し経時的に CMV-LTF 反応, PHA-LTF 反応を検索した.

CMV-LTF 反応では, 症例 K. H. が妊娠中期より反応陰性となり, 分娩後 6 カ月でも陽転しなかった. また, 症例 K. M. は妊娠前期, 中期に反応陰性で, 後期から陽転した. 症例 M. O. は妊娠が進むにつれ, 反応

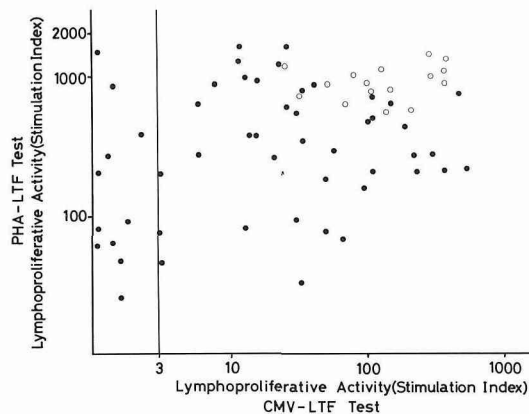


Fig. 7 Correlation between phytohemagglutinin (PHA) and cytomegalovirus (CMV)-specific lymphoproliferative activity in pregnant and non-pregnant women.

● : pregnant women  
○ : non-pregnant women

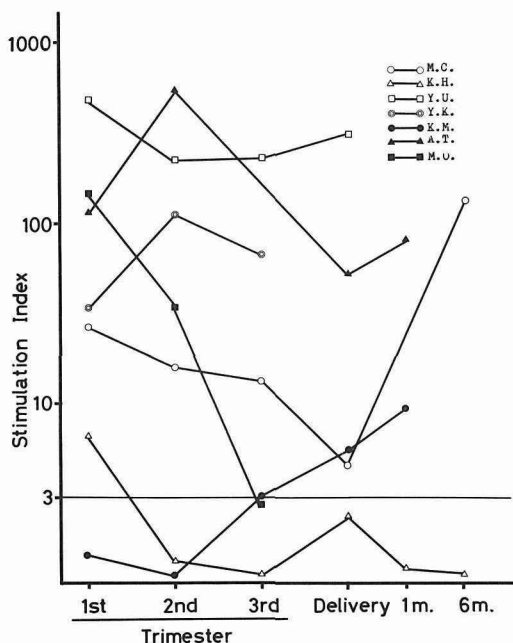


Fig. 8 Temporal changes in lymphoproliferative activity by cytomegalovirus (CMV) in seven pregnant women.

の低下を見せ, 後期で陰性となった. 他の症例では陽性反応を持続した. すなわち, 一定のパターンを認めなかった.

PHA-LTF 反応では症例 Y. K. を除き, 妊娠後期に向って SI 値の低下傾向が見られた.

なお, 妊娠経過中に, CMV-LTF 反応が陰性であった例も含めて, これら 7 例の妊婦の尿ならびに, 彼女らから出生した児の, 生後 2 日目の尿に CMV の排泄を検出し得なかった.

#### 4 考 察

種々のウイルス性疾患において, 宿主側の感染防禦機構として, 体液性免疫と細胞性免疫が関与していることは, 既に周知の事実である. その中で特に, ウイルス特異的細胞性免疫の成立は, cell-to-cell の感染様式をとる CMV, herpes simplex virus, varicella-zoster virus の排除に, 体液性免疫以上に, 重要であることが明らかにされ, その検索は感染病理学的機序の解明に役立っている.

細胞性免疫を *in vitro* で検索する手段は種々あるが, その中でも, LTF 試験は比較的簡便であり, CMV 抗原を用いた際, CMV に対する特異的細胞性免疫を反映することに関しては, 既に報告<sup>6)</sup>があり確立されている.

また, CMV-LTF 試験に関与するリンパ球の主体は, T-cell であるが, 全血培養法で見ると, B-cell や macrophage など他の因子の作用により, CMV-LTF

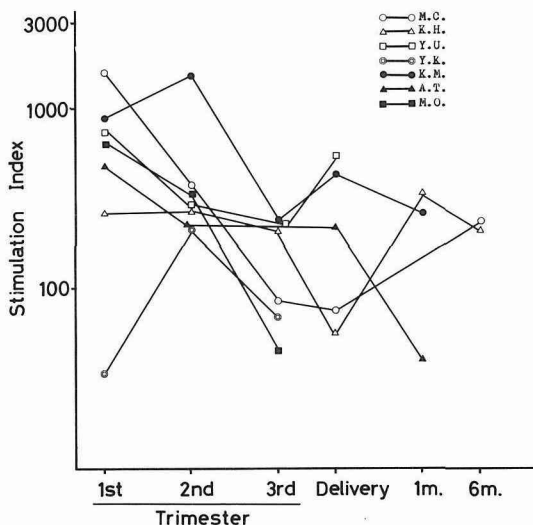


Fig. 9 Temporal changes in lymphoproliferative activity by phytohemagglutinin (PHA) in seven pregnant women.



反応は増強されることが示唆されている。

以上の研究報告を踏まえ、本研究ではCMV-LTF 試験を用い、先天性 CMV 感染児、後天性 CMV 感染児および妊婦を対象として、CMV 特異的細胞性免疫の経時的検索を行った。成績の問題点につき考察を加える。

#### 4・1 先天性 CMV 感染症における細胞性免疫反応の特殊性について

先天性 CMV 感染児の特異的細胞性免疫能については、既にいくつかの報告<sup>9-10)</sup>があるが、検索を経時的に進めたものは未だに見られない。

Gehrzt et al.<sup>9)</sup>は、LTF 試験を用い、4 例の先天性 CMV 感染児とその母親について、検討を加えている。4 例の患児の CMV-LTF 反応は、全例で SI 値 3.0 未満であったが、標準 mitogen として用いた PHA に対する反応は正常であった。母親は 4 例中 3 例が、SI 値 3.0 未満で反応陰性であった。このことから、彼らは retrospective に見て、母親の CMV 特異的細胞性免疫の欠落は、胎児への CMV 感染を容易にするであろうし、胎児においては感染によって特異的細胞性免疫能に抑制がかかり、体内での CMV 増殖が促進されると結論している。

また、Starr et al.<sup>10)</sup>は 8 例の先天性 CMV 感染児につき、CMV-LTF 反応と Interferon 産生能の検討を行い、共に低下していたと報告している。

Reynolds et al.<sup>11)</sup>は先天性 CMV 感染児 25 例および後天性 CMV 感染児 5 例で CMV-LTF 試験を行い、先天性感染児 10 例が反応陰性であった。

一方、Rola-Pleszczynski et al.<sup>12)</sup>は 8 例の先天性 CMV 感染児で、CMV-specific cytotoxicity 試験を行い、正常な<sup>51</sup>Cr-immune release を認めたと報告している。しかし、cytotoxicity 試験では、一般的に細胞障害的に働くリンパ球と標的細胞との間に主要組織抗原の一致がなければ、細胞障害性は生じないことが言われており、一方、cytotoxicity 試験と LTF 試験とでは、細胞性免疫反応の異った面を見ている可能性も考えられる。以上の、これまで報告されたいずれの成績においても、年齢を対応させた対照を置かなかったり、確かに後天性感染かどうかの検討を行なったりはしておらず、対照のとり方に問題がある。また、症候性感染と無症候性感染の比較や、経時的検索なども見られない。

そこで、著者の行った経時的検索の結果、後天性 CMV 感染では、尿中にウイルスを排泄し始める時点では、CMV-LTF 反応陽性 (SI 値 3.0 以上) になり、その後有意な反応が持続した。すなわち、CMV 尿を排泄す

る場合は全て、CMV-LTF 反応陽性であった。

これに対して、先天性 CMV 感染児では CMV-LTF 反応の遅延する場合が多く、特に症候性の場合に著しかった。症例 S. Y. は生後 5 カ月まで反応陰性であったが、1 歳時、SI 値: 42.4 と陽性化し、1 歳 7 カ月時、SI 値: 4.5 であった。症例 N. M. は、1 歳と 1 歳 5 カ月時に CMV-LTF 反応陰性であったが、1 歳 8 カ月より陽性化した。症例 Y. K. は生後 5 カ月、9 カ月、12 カ月と、いずれも反応が陰性であった。

以上の結果から、先天性 CMV 感染児におけるウイルス特異的細胞性免疫の障害は、これまで言われてきたような欠損ではなく、反応の遅延であることが明らかとなった。

先天性感染と後天性感染におけるウイルス特異的細胞性免疫反応の差は、感染時期による免疫学的未熟性の相違、あるいは、viral immunosuppression の作用の違いなどの可能性が考えられるが不明である。他のウイルス抗原に対する反応は見なかったが、少なくとも PHA に対する反応の抑制は認められなかった。Ten Napel et al.<sup>5)</sup>は、成人 18 例の急性 CMV 感染者につき経時的に、CMV-LTF 試験を行った結果、急性期にもっとも強く反応が抑えられ、その後、徐々に反応の正常化が見られたと報告しており興味深い。

マウスの CMV 感染実験では、感染により宿主の免疫機構に抑制的に働くことが既に報告されており<sup>21,22)</sup>メカニズムは不明ながら、ヒトにおいても同様の機序の作用は充分考えられる<sup>5)</sup>。

しかし、ヒト CMV による免疫抑制作用が一時的なものであるのか、あるいは恒常的な欠損につながるものなのか、その解明に従来の one point study では不十分であった。その様な折、Ten Napel et al.<sup>5)</sup>や、著者が CMV-LTF 反応の経時的検索を行い、新知見を出したことは大変意義深いと言えよう。

CMV 株間に血清型の違いが存在する可能性については、Weller et al.<sup>23)</sup>の成績を除いて、否定的見解が多い。しかし、Beutner et al.<sup>24)</sup>は、CMV 感染児において、CMV の strain-specific な細胞性免疫反応が認められると報告している。著者は症候性先天性 CMV 感染児 1 例 (症例 N. M.) で尿より分離したウイルスから、抗原を作製し AD169 株と比較して LTF 反応を検討したが、有意差は得られなかった。このことから先天性 CMV 感染児における、CMV-LTF 反応陰性の成績を、抗原として用いる CMV 株の違いでは説明できないことが分かった。

病歴から胎内感染症が疑われ CMV が分離されても、



生後 1 カ月以上経過している症例では、先天性 CMV 感染症と診断してよいのか、あるいは、ウイルス尿がたまたま、産道感染を含む後天性感染の結果であるのか、判別するのは極めて困難であった。このような場合に、CMV と PHA に対する LTF 試験を行い、ウイルス尿などによって CMV 感染が証明されるにもかかわらず、CMV-LTF 反応が陰性の場合には、retrospective に先天性 CMV 感染症と診断し得る可能性が考えられる。また、transfer factor などによる細胞性免疫強化療法の理論的根拠にもなるので、今後更に、診断と治療に対する応用面を含めて、検索を進める必要があろう。

#### 4・2 妊娠経過中における細胞性免疫反応について

従来から妊娠により、その母体の免疫能は低下すると言われており、<sup>25)</sup> 感染防禦能の低下とともに種々の感染症に対して、感受性が増大することが問題にされている。

CMV もその例<sup>26)</sup>にもれないが、CMV の場合は初感染の他に、潜伏感染していたウイルスが、宿主の免疫能の低下に伴って、再活性化される現象<sup>27)</sup>があり、いずれの場合にも胎児感染を起す可能性のあることが、指摘されている。特に、CMV の再活性化という現象が、CMV に対する血清抗体価の存在下に起り得るという事実<sup>28)</sup>は、宿主の感染防禦機構における細胞性免疫の作働異常を示すものであり、妊娠経過中における細胞性免疫の研究は先天性 CMV 感染症の病態発生機序の解明にも一助をなすと思われる。

以上の前提を踏まえ、著者は妊婦における CMV 特異的細胞性免疫反応の低下を予想し、CMV-LTF 試験を用いて検索を行った。先天性 CMV 感染児の母親についても、同試験にて検索を行い、非妊娠女性との比較を行った。

CMV-LTF 試験に平行して、PHA-LTF 試験も行ったところ、両反応とも妊婦では、非妊娠女性に比べ有意に反応が低下していた。

とくに、CF 抗体陽性の妊婦 54 例中 13 例(24%)に、CMV-LTF 反応陰性例が出現した。対照の非妊娠女性では、CF 抗体陽性のものは、全例 CMV-LTF 反応も陽性であったことから、CF 抗体陽性、LTF 反応陰性という解離現象は、妊婦に特異的と考えられた。

CMV の体内における増殖の指標と考えられている EA 抗体と、CMV-LTF 反応との関連性を検討したが、EA 抗体陽性群と陰性群で CMV-LTF 反応の程度に有意差はなかった。ただし、いずれの群でも対照に比し、妊婦は有意に低い反応を示した。すなわち、EA 抗体を指標とする限り、CMV-LTF 反応の低下と、CMV の

体内増殖との関連性を直接示唆する成績は得られなかった。

先天性 CMV 感染児の母親の CMV-LTF 反応も非妊娠女性と比較して、有意に低下していた。しかし、この低下が胎児感染発生と関係あるのかどうかは不明であった。

妊娠前期に検索し得た妊婦のうち 7 例を、経時的に追い LTF 反応の推移を見た所、3 例が経過中 CMV-LTF 反応陰性を経験したが、妊娠期間との関係で一定のパターンは認めなかった。PHA-LTF 反応は、1 例を除き、妊娠後期に向って SI 値の低下傾向が見られた。

以上述べた CMV-LTF 反応の低下で示された妊娠経過中における、ウイルス特異的細胞性免疫反応の低下の機序については、妊婦においては PHA-LTF 反応有意低下も認めたことや CMV-LTF 反応が陰性であった妊婦では PHA-LTF 反応も著しく低下していたことなどから、妊娠による非特異的な細胞性免疫能の低下に伴う現象と理解された。

なお、CMV 抗原と PHA に対する反応において SI 値に相関を認めなかったことについては、PHA に対する反応は一般的な T-cell 機能を反映するのに対して、CMV-LTF 反応では、CMV の感染歴によって反応する細胞の比率が個体によって異なるので当然のことと思われる。

一般的に、PHA-LTF 試験で反応する細胞は T-cell と言われており、また、CMV-LTF 試験で反応するリンパ球の主体も T-cell である<sup>29)</sup>しかし、妊婦の血清(あるいは血漿)中には、種々の免疫的抑制因子が存在することが知られている<sup>28)</sup>ので、本研究のように全血培養法を用いた場合には、妊婦における CMV-LTF 反応低下を、直ちに CMV 抗原に対する、T-cell を主体とした細胞機能の低下と考えることは出来ない。今回の検索では、抑制機序の解析まで行い得なかったが、血液中の全ての細胞、液性因子を含む全血培養法は、生体内環境に近いとも考えられるので、妊婦における CMV-LTF 反応の低下は、妊娠経過中における、生体内の CMV 特異的細胞性免疫反応の、低下状態を反映するものと考えられよう。

なお、CMV-LTF 反応の低下を認めた妊婦より出生した児から、新生児期にウイルス尿を検出できなかったので、妊娠経過中のウイルス特異的細胞性免疫反応の低下が、子宮内胎児感染に果たす役割を証明することはできなかった。しかし、この点については、更に検索が必要と思われる。

最近、モルモットなど CMV で胎内感染実験が成功

しているので、<sup>29)</sup>今後このような動物実験モデルによる検索も、合せ行い必要があらう。

## 5 結 語

**5・1** 先天性 cytomegalovirus (CMV) 感染児におけるウイルス特異的細胞性免疫の動態を検索するため、対象として、症候性先天性 CMV 感染児 6 例、無症候性先天性 CMV 感染児 11 例、後天性 CMV 感染児 3 例、CMV 非感染児 5 例について、Lymphocyte Transformation (LTF) 試験を用い、経時的に検索を行い、以下の成績を得た。

**5・1・1** CMV-LTF 反応の月齢別 stimulation index (SI) 値分布では、後天性感染群は全例 SI 値 3.0 以上であったが、非感染群では 38 例中 2 例を除いて SI 値 3.0 未満であった。以上により SI 値 3.0 を陽性限界とした。一方、先天性感染群では、生後早期には SI 値 3.0 未満がかなり見られ、月齢が進むにつれて有意な反応を示し、検査総数 47 例中 18 例 (38%) に反応陰性例を認めた。

**5・1・2** CMV-LTF 反応の経時的検索の結果後天性感染群では、生後ウイルス尿陽性となった時点で CMV-LTF 反応も陽性となり、その後も有意の反応を持続した。先天性感染群では、生後早期に CMV-LTF 反応陰性であって、後に陽性となる例が見られ、この遅延現象は、症候性 CMV 感染児で著明であった。

**5・1・3** PHA-LTF 反応は、先天性感染群、後天性感染群、非感染群の 3 例の間で有意差はなかった。

**5・1・4** これらの成績より、先天性 CMV 感染児における特異的細胞性免疫の障害は、欠損ではなく反応の遅延であることが示された。

**5・2** 妊婦における CMV の再活性化現象にウイルス特異的細胞性免疫の異常が関与している可能性を考え、補体結合 (CF) 抗体 4 倍以上陽性の妊婦 54 例、非妊娠女性 16 例、先天性 CMV 感染児の母親 14 例、計 84 例の対象について、LTF 試験を用いて検索し、以下の成績を得た。

**5・2・1** 非妊娠女性では、全例 CMV-LTF 反応陽性であったが、妊婦では 24% において反応陰性が見られた。また、CMV-LTF 反応の平均 SI 値は、非妊娠女性に比して、妊婦および先天性 CMV 感染児の母親で有意に低かった。しかし、妊娠各期間では有意差を認めなかった。

**5・2・2** PHA-LTF 反応も、妊婦、先天性 CMV 感染児の母親では、非妊娠女性に比して有意に低下していたが、妊娠各期間で差を認めなかった。また、妊婦に

おいて、CMV-LTF 反応陰性で、PHA-LTF 反応が著明に低下している者が多かった。

**5・2・3** 7 例の妊婦につき、妊娠前期より経時的に CMV-LTF 反応を行ったところ、3 例で経過中に反応陰性を経験した。しかし、妊娠時期との関係では一定のパターンを示さなかった。

**5・2・4** 以上の成績より、妊娠による非特異的細胞性免疫能の低下に随伴して、CMV 特異的細胞性免疫反応も低下するものと考えられた。しかし、ウイルス分離あるいは EA 抗体価測定成績から、妊婦における細胞性免疫の低下が、CMV の再活性化あるいは胎児感染の成立に果す役割を、積極的に支持する所見を得ることはできなかった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた千葉峻三助教授ならびに実験遂行に当って御協力戴いた教室の諸先生に深謝致します。

なお、妊婦の検索に御協力戴いた札幌医大産婦人科橋本正淑教授ならびに同看護室スタッフ一同、症候性 CMV 感染児につき検索の機会を与えられた九州大学小児科布上 薫先生、名古屋中京病院小児科水野愛子先生、愛媛大学小児科渡部雅愛先生、北海道立小児保健センター田村 正先生ならびに砂川市立病院小児科松本猛先生に深謝致します。

本研究の一部は、厚生省研究助成金の援助を受けた。

なお、本論文の要旨は第 10 回小児ウイルス病研究会 (神戸、1979) および第 11 回小児ウイルス病研究会 (東京、1980) で発表した。

## References

1. Pollard, R. B., Rand, K. H., Arvin, A. M. and Merigan, T. C.: Cell mediated immunity to cytomegalovirus infection in normal subjects and cardiac transplant patients. *J. Infect. Dis.* **137**, 541-549 (1978).
2. Linnemann, Jr., C. C., Kauffman, C. A., First, M. R., Schiff, G. M. and Phair, J. P.: Cellular immune response to cytomegalovirus infection after renal transplantation. *Infect. Immun.* **22**, 176-180 (1978).
3. Tamura, T., Chiba, S., Abo, W., Chiba, Y. and Nakao, T.: Cytomegalovirus-specific lymphocyte transformations in subjects of different ages with primary immunodeficiency. *Infect. Immun.* **28**, 49-53 (1980).

4. Ten Napel, Chr. H. H., and The, T. H.: Acute cytomegalovirus infection and the host immune response. I. Development and maintenance of cytomegalovirus (CMV) induced in vitro lymphocyte reactivity and its relationship to the production of CMV antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **39**, 263-271 (1980).
5. Ten Napel, Chr. H. H., and The, T. H.: Acute cytomegalovirus infection and the host immune response. II. Relationship of suppressed in vitro lymphocyte reactivity to bacterial recall antigens and mitogens with the development of cytomegalovirus-induced lymphocyte reactivity. *Clin. Exp. Immunol.* **39**, 272-278 (1980).
6. Ten Napel, Chr. H. H., The, T. H., Bijker, J., De Gast, G. C., and Langenhuysen, M. M. A. C.: Cytomegalovirus-directed lymphocyte reactivity in healthy adults tested by a CMV-induced lymphocyte transformation test. *Clin. Exp. Immunol.* **29**, 52-60 (1977).
7. Agatsuma, Y., Fitzpatrick, P., Baliah, T., Kaul, A., Kim, P. K. and Ogra, P. L.: Cell-mediated immunity to cytomegalovirus in patients receiving immunosuppressive therapy. *J. Med. Virol.* **4**, 147-157 (1979).
8. 田村正, 千葉峻三, 安保亘, 中尾亨: 先天性 cytomegalovirus 感染症児における特異的細胞性免疫反応の意義. *医学のあゆみ* **110**, 541-543 (1979).
9. Gehrz, R. C., Marker, S. C., Knorr, S. O., Kalis, J. M. and Balfour, H. H.: Specific cell-mediated immune defect in active cytomegalovirus infection of young children and their mothers. *Lancet* **2**, 844-847 (1977).
10. Starr, S. E., Tolpin, M. D., Friedman, H. M., Paucker, K. and Plotkin, S. A.: Impaired cellular immunity to cytomegalovirus in congenitally infected children and their mothers. *J. Infect. Dis.* **140**, 500-505 (1979).
11. Reynolds, D. W., Dean, P. H., Pass, R. F. and Alford, C. A.: Specific cell-mediated immunity in children with congenital and neonatal cytomegalovirus infection and their mothers. *J. Infect. Dis.* **140**, 493-499 (1979).
12. Rola-Pleszczynski, M., Frenkel, L. D., Fuccilo, D. A., Hensen, S. A., Vincent, M. M., Reynolds, D. W., Stagno, S. and Bellanisti, J. A.: Specific impairment of cell-mediated immunity in mothers of infants with congenital infection due to cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* **135**, 386-391 (1977).
13. Stern, H.: Intrauterine and perinatal cytomegalovirus infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **5**, 81-85 (1979).
14. Hirschhorn, K., Bach, F., Kolodny, R. L., Firschein, I. L., and Hashem, N.: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science* **142**, 1185-1187 (1963).
15. Rowe, W. P., Hartley, J. W., Waterman, S., Turner, H. C. and Huebner, R. J.: Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 418-424 (1956).
16. Sever, J. R.: Application of microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.* **88**, 320-329 (1962).
17. The, T. H., Klein, G. and Langenhuysen, M. M. A. C.: Antibody reactions to virus-specific early antigens (EA) in patients with cytomegalovirus (CMV) infection. *Clin. Exp. Immunol.* **16**, 1-12 (1974).
18. Schmidt, N. J. and Lennette, E. H.: Rubella complement-fixing antigens derived from the fluid and cellular phases of infected BHK-21 cells; Extraction of cell-associated antigen with alkaline buffers. *J. Immunol.* **97**, 815-821 (1966).
19. Pauly, J. L., Sokal, J. E. and Han, T.: Whole-blood culture technique for functional studies of lymphocyte reactivity to mitogens, antigens and homologous lymphocytes. *J. Lab. Clin. Med.* **82**, 500-512 (1973).
20. 田村正: cytomegalovirus 感染症における感染防禦機構に関する研究II, 特異的細胞性免疫の成立とその意義. *札幌医誌* **48**, 75-90 (1979).
21. Howard, R. H., Mattson, D. M. and Balfour, H. H.: Effect of immunosuppression on humoral and cell-mediated immunity to murine cytomegalovirus (40549). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **161**, 341-346 (1979).
22. Hudson, J. B.: The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Arch. Virol.* **62**, 1-29 (1979).
23. Weller, T. H., Hanshaw, J. B. and Scott, D. E.: Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* **12**, 130-132 (1960).
24. Beutner, K. R., Morag, A., Deibel, R., Morag, B., Raiken, D. and Ogra, P. L.: Strain-specific local and systemic cell-mediated immune responses to cytomegalovirus in humans. *Infect. Immun.* **20**, 82-87 (1978).
25. Gall, S. A.: Maternal immune system during

- human gestation. *Semin. Perinatol.* **1**, 119-133 (1977).
26. Griffiths, P. D., Campbell-Benzie, A. and Heath, R. B.: A prospective study of primary cytomegalovirus infection in pregnant women. *Brit. J. Obstet. Gynaecol.* **87**, 308-314 (1980).
27. Stagn, S., Reynolds, D. W., Huang, E-S., Thames, S., Smith, R. J. and Alford, C. A.: Congenital cytomegalovirus infection; occurrence in an immune population. *N. Engl. J. Med.* **296**, 1254-1258 (1977).
28. 竹内正七, 金沢浩二, 湯沢秀夫 妊娠と免疫能. *臨床免疫* **11**, 742-748 (1979).
29. Kumar, M. L. and Nankervis, G. A.: Experimental congenital infection with cytomegalovirus: a guinea pig model. *J. Infect. Dis.* **138**, 650-654 (1978).
- 

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学小児科学講座 岡部 稔